

**sanofi aventis**

Because health matters

U.S. Patent Operations**Via Facsimile No. 571-273-0855**

Examiner Patricia Duffy
U.S. Patent & Trademark Office
Group Art Unit: 1645

Via Facsimile

George Jones
Senior Director, Biotechnology
Direct Line: (908) 231-3776
Telefax: (908) 231-2626
George.Jones@sanofi-aventis.com

November 9, 2006

Pages: 21 (including cover sheet)

Re: U.S. Patent Application Serial No. 10/076,634
Filed February 19, 2002
Our Docket No. DEAV2001/0009 US NP

Dear Examiner Duffy:

In response to your telephone request, enclosed is a copy of the priority document, DE 202 08 212.6.

George Jones, Reg. No. 38,508
Attorney for Applicant

• Route 202-206, P.O. Box 6800, Bridgewater, New Jersey 08807, U.S.A. www.sanofi-aventis.com • Telephone 908 231 3800 • Fax 908 231 2626 •

NOTICE: The documents accompanying this telecopy transmission are intended only for the use of the individual or entity named above. If you have received this telecopy in error, please immediately notify the sender by telephone to arrange for the return of the original documents.

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 08 MAR 2002

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 08 212.6

Anmeldetag: 20. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Fusionsprotein zur Sekretion von Wertprotein
in bakterielle Überstände

IPC: C 12 N, C 07 K, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

A 9161
09/00
EDV-L

Aventis Pharma Deutschland GmbH

AVE D-2001/A009

Dr. OL

Fusionsprotein zur Sekretion von Wertprotein in bakterielle Überstände

5 Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf Fusionsproteine bestehend aus einem Fusionsteil und einem Wertprotein wobei die Kombination aus beiden Proteinen dazu führt, daß das Fusionsprotein in den Überstand eines bakteriellen Wirtes sezerniert wird und das Wertprotein in seiner korrekten räumlichen Struktur vorliegt. Die Gensequenz für das Fusionsprotein ist Bestandteil einer Expressionskassette, die die Expression in einem bakteriellen Wirt erlaubt. Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Fermentation, Expression und Aufarbeitung eines derartigen Fusionsproteins unter Verwendung der Expressionskassette, ein Plasmid enthaltend die Expressionskassette, eine bakterielle Wirtszelle enthaltend die Expressionskassette chromosomal integriert und / oder als Replikon z.B. als Plasmid, das genannte Fusionsprotein mit Hirudin oder einem Derivat hiervon als Fusionsteil, ein Verfahren zur Herstellung von Insulin oder eines Insulinderivats und die Verwendung der Expressionskassette in den Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins aus Hirudin oder Derivaten hiervon und Insulin oder eines Insulinderivats.

Die Entwicklung von optimierten Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln auf der Basis rekombinanter Proteine stellt eine Aufgabe dar, die möglichst zwei Gesichtspunkten gerecht werden muß. Zum einen soll ein Verfahren möglichst kostengünstig sein und zum anderen soll das Produkt von höchster Reinheit sein.

Die Wahl des Expressionssystems bestimmt dabei den Weg des jeweiligen Herstellungsprozesses, wobei dem Fachmann klar ist, daß durch die Entwicklung neuer proteinchemischer Techniken und die Vielfalt der biochemischen Möglichkeiten und die Neukombination bekannter Techniken stets Verbesserungen bestehender Verfahren möglich sind.

Die Eigenschaften eines gewünschten Proteins bestimmen entscheidend die Wahl des zur Synthese verwendeten Wirtszellsystems. Bakterien wie E. coli stellen das System dar, mit dessen Hilfe in preiswerten Medien schnell Proteine mit

Rohausbeuten von mehreren Gramm hergestellt werden können. Zum Tragen kommt das System vor allem für Proteine, die nicht modifiziert werden müssen und die sich in vitro zu der biologisch aktiven Form renaturieren lassen. Für Proteine mit hohem Mengenbedarf, wie z.B. Insulin, strebt man dabei Expressionsraten an, die zu intrazellulärer Anreicherung des Proteins in Form von Einschlusskörpern führt. Nach Zellaufschluß wird das Protein gelöst und dann in weiteren Verfahrensschritten gefaltet. Der Prozeß der Faltung läuft jedoch nicht quantitativ ab. Gründe hierfür können in irreversibler Schädigung bei der Einschlusskörperbildung, in entsprechender Schädigung beim Zellaufschluß und in Fehlern bei der Faltung gesucht werden. "Falsch" gefaltete oder modifizierte Moleküle müssen dann in weiteren Trennschritten abgetrennt werden. Dies wirkt sich negativ auf die Herstellkosten aus. Zudem finden sich Spuren dieser Moleküle auch im Endprodukt wieder. Da für Arzneimittel hohe Reinheitskriterien gelten, ist eine entsprechend sorgfältige und kostenintensive Reinigung erforderlich. Wünschenswert aufgrund des günstigen Kosten / Rohausbeute – Verhältnisses wären Verfahren, die die Ausschleusung des Wertproteins in korrekt gefalteter Form in das Kulturmedium durch E. coli erlauben. Allerdings ist dies bisher nur in Ausnahmefällen gelungen.

Die internationale Patentanmeldung PCT/EP00/08537 beschreibt eine solche Ausnahme. Es gelang, die Synthese und Ausschleusung von Lepirudin, dem Wirkstoff des Arzneimittels Refludan®, durch E. coli in Grammmengen, wenn man spezifische Signalsequenzen zur Ausschleusung verwendet. Die deutsche Patentanmeldung Nr. 100 33 195.2 (unveröffentlicht) beschreibt ein bifunktionelles Protein aus Hirudin und Derivaten des Hirudins und dem FaktorXa - Inhibitor aus Zecken und Derivaten hiervon. Dieses Protein läßt sich ebenfalls mit hohen Ausbeuten durch E.coli synthetisieren und ausschleusen. In Erweiterung dieses Befundes wurde nun überraschend gefunden, daß Hirudin nicht nur als Fusionsprotein mit TAP sondern auch als Teil eines Fusionsproteins mit Polypeptiden wie Proinsulinderivaten mit hohen Ausbeuten ausgeschleust wird, dabei biologisch aktiv ist und überraschenderweise ein Fusionspartner wie Proinsulin in korrekter Raumstruktur vorliegt. Dieses unerwartete Ergebnis führt dazu, daß man z.B. Insulin kostengünstiger durch bakterielle Wirts / Vektorsysteme herstellen kann, da auf den mit nicht zu vernachlässigenden Ausbeuteverlusten verbundenen Schritt der in vitro Rückfaltung nach intrazellulärer Expression verzichtet werden kann und

man so zu einem einfacheren proteichemischen Reinigungsverfahren kommt. Ein weitere Vorteil liegt darin, daß man chaotrope Hilfsmittel, die bei klassischen Verfahren zur Insulinproduktion in *E. coli* zum Lösen des Fusionsproteins zugesetzt werden, nicht benötigt. Dies führt im ökologischen Sinn zu einer geringeren
5 Belastung der Umwelt durch das Vermeiden der entsprechenden Abfälle.

Blutegel vom Typ *Hirudo* entwickelten z.B. verschiedene Isoformen des Thrombininhibitors Hirudin. Durch künstliche Variation des Moleküls, z.B. Austausch der N-terminalen Aminosäure, wurde Hirudin für pharmazeutisch technische
10 Anforderungen optimiert (z.B. EP-A 0 324 712).

Die Erfindung beinhaltet die Verwendung von Hirudin und Hirudinvarianten zur Bildung von Fusionsproteinen, z.B. mit Affen – Proinsulin oder Derivaten hiervon. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine der natürlichen Isoformen
15 des Hirudins (die natürlichen Isoformen werden zusammen als „Hirudin“ bezeichnet) verwendet. Natürliche Isoformen sind z.B. Val-Val-Hirudin oder Ile-Thr – Hirudin. In anderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine Variante einer natürlichen Hirudin Isoform eingesetzt. Eine Variante leitet sich von einer natürlichen Isoform des Hirudins ab, enthält aber z.B. zusätzliche Aminosäuren und/oder
20 Aminosäuredeletionen und/oder Aminosäureaustausche im Vergleich zu der natürlichen Isoform. Eine Variante von Hirudin kann alternierend Peptidabschnitte natürlicher Isoformen des Hirudins und neue Aminosäuren enthalten. Varianten des Hirudins sind bekannt und z.B. in DE 3 430 556 beschrieben. Varianten des Hirudins sind als Protein kommerziell erhältlich (Firma Calbiochem® Biochemicals,
25 Cat.no.377-853, -950-960).

Insulin ist ein Polypeptid aus 51 Aminosäuren, die sich auf 2 Aminosäureketten verteilen: die A Kette mit 21 Aminosäuren und die B-Kette mit 30 Aminosäuren. Die Ketten sind durch 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden. Insulinzubereitungen
30 werden seit vielen Jahren zur Diabetestherapie eingesetzt. Dabei werden nicht nur natürlich vorkommende Insuline verwendet, sondern auch Insulinderivate und -analoga.

Insulinderivate sind Derivate von natürlich vorkommenden Insulinen, nämlich Humaninsulin oder tierischen Insulinen, welche sich durch Substitution wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes und/oder Addition wenigstens eines Aminosäurerestes und/oder organischen Restes von dem entsprechenden, ansonst gleichen natürlich vorkommenden Insulin unterscheiden.

In der Regel haben Insulinderivate gegenüber humanem Insulin eine etwas veränderte Wirkung.

10 Insulinderivate mit beschleunigtem Wirkungseintritt werden in EP 0 214 826, EP 0 375 437 und EP 0 678 522 beschrieben. EP 0 124 826 bezieht sich u.a. auf Substitutionen von B27 und B28. EP 0 678 522 beschreibt Insulinderivate die in der Position B29 verschiedene Aminosäuren, vorzugsweise Prolin, aufweisen, jedoch nicht Glutaminsäure. EP 0 375 437 umfaßt Insulinderivate mit Lysin oder Arginin in
15 B28, die optional zusätzlich in B3 und/oder A21 modifiziert sein können.

In der EP 0 419 504 werden Insulinderivate offenbart, die gegen chemische Modifikationen geschützt sind, in dem Asparagin in B3 und wenigstens eine weitere Aminosäure in den Positionen A5, A15, A18 oder A21 verändert sind.

20

In der WO 92/00321 werden Insulinderivate beschrieben, bei denen wenigstens eine Aminosäure der Positionen B1-B6 durch Lysin oder Arginin ersetzt ist. Derartige
Insuline weisen gemäß WO 92/00321 eine verlängerte Wirkung auf.

25 Bei der gentechnischen Herstellung von Insulin und Insulinderivaten wird häufig ein Insulinvorläufer, ein sog. Proinsulin exprimiert, welches aus einer B-, C- und A-Kette besteht. Dieses Proinsulin kann durch enzymatische oder chemische Abspaltung der C-Kette nach entsprechender korrekter Faltung und Ausbildung der Disulfidbrücken in Insulin oder ein Insulinderivat überführt werden. Häufig erfolgt die Expression des
30 Proinsulins in Form eines Fusionsproteins. Der „unerwünschte“ Fusionspartner muß ebenfalls chemisch oder enzymatisch entfernt werden.

Es ist dem Fachmann klar, daß die Wahl des rekombinanten Wirts / Vektorsystems die Methoden zur Anzucht, Vermehrung und Fermentation der rekombinanten Zellen bestimmt. Dies ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

- 5 Das Fusionsprotein ist im sauren Medium überraschend gut löslich. Daraus ergeben sich deutliche Vorteile bzgl. der proteinchemischen Aufarbeitung. Zum einen werden viele unerwünschte Komponenten des Überstandes unter diesen Bedingungen ausgefällt und zum anderen sind Peptidasen oder Proteasen inaktiv. Durch Ansäuern der Fermentationsbrühe am Ende des Arbeitsganges können somit
10 unerwünschte Überstandsproteine direkt mit den Wirtszellen von dem Fusionsprotein separiert, und in einem weiteren Schritt konzentriert werden. Dies ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

- Am Ende der Fermentation kann der Faltungsvorgang noch nicht zu 100%
15 abgeschlossen sein. Durch Zugabe von Mercaptan oder z.B. Cysteinhydrochlorid kann der Vorgang abgeschlossen werden. Dies ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

- Fusioniert man beide Proteine über ein Brückenglied aus Aminosäuren, die
20 spezifisch durch Endoproteasen erkannt werden, die das Fusionsprotein an keiner anderen Stelle effizient spalten, so läßt sich das Protein von Interesse direkt aktiv abspalten. Im Falle der Herstellung von Insulin enthält das Brückenglied zwischen Hirudin und Proinsulin vorzugsweise am carboxyterminalen Ende ein Arginin. In einer simultanen Prozessierung kann dann bei Umsetzung mit Trypsin der
25 Fusionsteil abgespalten und Proinsulin zu Mono – bzw. Di-Arg – Insulin umgewandelt werden. Dieses Brückenglied ist im Hinblick auf die Prozessierung des Insulins so zu optimieren, daß die Abspaltung des Hirudinteils nicht langsamer abläuft als die Spaltungen an der die Insulin B und A- Kette verbindenden C Peptidsequenz oder einem Derivat hiervon. Dies ist ebenfalls Gegenstand der
30 Erfindung. Als Expressionssystem läßt sich beispielsweise der im europäischen Patent 0 468 539 in Figur 1 beschriebene Vektor pJF118 verwenden.

Plasmide, die DNA – Sequenzen , die Proinsulin oder Proinsuliderivate kodieren, sind z.B. in den Patentschriften EP-A 0 489 780 bzw. PCT/EP00/08537 beschrieben.

Das Plasmid pK152, das die Sequenz für Hirudin gemäß EP-A 0 324 712 enthält, wird als Quelle die DNA-Sequenz für Hirudin verwendet.

- 5 Wichtig für die Sekretion ist die Exportkompatibilität des Proteins von Interesse für den Durchtritt durch die innere Bakterienmembran des Bakteriums. Wichtig dafür ist die Wahl der Signalsequenz, die für unterschiedliche Proteine unterschiedlich optimal sein kann. Die Patentanmeldung PCT/EP00/08537 beschreibt ein System des PCR-gestützten Signalsequenz Screenings. Dieses System läßt sich auch auf
- 10 Fusionsproteine mit Hirudin als N- terminalen Fusionsteil anwenden, da die Hirudinaktivität überraschend erhalten bleibt und somit leicht im Überstand mittels des Thrombinhemmtests nachweisbar wird.

- Gegenstand der Erfindung ist somit eine DNA kodierend ein Fusionsprotein der
- 15 Form

- F-As_m-R_n-Y - ,

wobei

- 20 F eine DNA - Sequenz kodierend für eine Aminosäurefolge, die die Sekretion eines Proteins Y in ein Fermentationsmedium erlaubt,
- As eine chemische Bindung oder eine DNA - Sequenz kodierend für eine gentechnisch kodierbare Aminosäure,
- m eine ganze Zahl von 0 - 10,
- 25 R eine chemische Bindung oder ein Codon für Arginin,
- n 0 oder 1,
- Y eine DNA - Sequenz kodierend für ein Protein von Interesse, das korrekt gefaltet als Bestandteil des Fusionsproteins im Fermentationsmedium vorliegt;
- 30 bedeutet, wobei insbesondere eine DNA - Sequenz gewählt wird, die für Hirudin oder ein Derivat hiervon (F) und Proinsulin oder einem Derivat hiervon (Y) kodiert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Expressionskassette der Form

$P - S - F - A_{sm} - R_n - Y - T,$

wobei

- 5 P einen Promotor,
 S eine DNA - Sequenz kodierend für eine Signalsequenz, die optimale
 Ausbeuten, erlaubt
 T eine nichttranslatierte, die Expression verstärkende DNA-Sequenz
bedeutet.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Plasmid enthaltend eine oben
beschriebene Expressionskassette und eine Wirtszelle enthaltend das genannte
Plasmid, oder eine Wirtszelle welche vorzugsweise die Expressionskassette in das
Genom der Wirtszelle integriert enthält; und wobei Wirtszelle ausgewählt wird aus
15 einer Gruppe enthaltend E.coli, B. subtilis und Streptomyces.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen
Herstellung eines Fusionsproteins wie oben beschrieben, wobei

- 20 (a) eine Expressionskassette wie oben beschrieben in einer Wirtszelle wie
 oben beschrieben exprimiert und
 (b) das exprimierte Fusionsprotein isoliert wird;

wobei insbesondere zur Isolation des exprimierten Proteins der Überstand von den
Wirtszellen getrennt wird, und das exprimierte Protein aus dem Überstand isoliert
25 wird; und wobei ein Verfahrensschritt zur Anreicherung des exprimierten Proteins im
Überstand nach der Fällung ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend
Mikrofiltration, hydrophobe Interaktionschromatographie und
Ionenaustauschchromatographie und wobei eine besondere Ausgestaltung darin
liegt, daß die Isolation des exprimierten Proteins einen Schritt umfaßt, bei dem
30 Komponenten des Kulturmediums des Überstandes gefällt werden, während das
exprimierte Protein in Lösung bleibt; und wobei in einer weiteren bevorzugten
Ausführungsform der Erfindung nach dem Ende der Fermentation dem
Fermentationsüberstand bei einem pH-Wert von 6 - 9 Mercaptan oder

Cysteinhydrochlorid zugesetzt wird, so daß sich eine Konzentration freien SH-Gruppen von 0,05 bis 2,5 mM ergibt.

Eine besondere Ausgestaltung des Verfahrens liegt darin, daß der Fermentationsüberstand von den Wirtszellen getrennt wird, die Wirtszellen in
5 frischem Medium weiter kultiviert und das sezernierte Fusionsprotein aus dem Überstand isoliert wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Insulin oder einem Insulinderivat, wobei

- 10 (a) aus dem exprimierten Protein, welches in einem Verfahren wie oben beschrieben erhalten wird,
- (b) durch enzymatische oder chemische Spaltung das Wertprotein insbesondere Insulin oder Insulinderivat freigesetzt und
- (c) isoliert wird.

15 Die Erfindung wird im folgenden durch die Beispiele, welche nicht beschränkend wirken sollen, näher beschrieben.

Beispiel 1: Konstruktion eines Lepirudin-GNSAR-Affenproinsulin Fusionsproteins, angeschlossen an die Signalsequenz des oprF-Genproduktes aus *Pseudomonas*
20 *fluorescens*

In Beispiel 2 der Patentanmeldung PCT/EP00/08537 wurde ein Expressionsvektor beschrieben, der die Expression und Sekretion von Refludan über die Signalsequenz des oprF-Genproduktes aus *Pseudomonas fluorescens* (De, E. et al. FEMS
25 Microbiol Lett. 127,263 -272, 1995) in das Medium von *E. coli* erlaubt. Dieser Vektor dient als zur Konstruktion eines Refludan-GNSAR-Affenproinsulinfusionsproteins (GNSAR=SEQ ID NO.: 1) . Er erhält die Bezeichnung pBpfu_hir.

30 Ausgangsmaterialien sind ferner DNA der Plasmide pJF118 (EP 0 468 539) und pK152 (PCT/EP00/08537). Folgende Oligonukleotide werden benötigt:

Primer pfuf1

5'GGTTCTCTTA TTGCCGCTAC TTCTTTCGGC GTTCTGGCAc ttacgtatac
tgactgca 3'

(SEQ ID NO.: 2)

Primer Insu11hind3

5' - TTTTTAAGCT TCATGTTTGA CAGCTTATCA T -3' (SEQ ID NO.: 3)

5

Primer Hir_insf1

5' ATCCCTGAGG AATACCTTCA GGGAAATTCG GCACGATTG TG - 3' (SEQ ID NO.: 4)

10 Primer Hir_insev1

5' - CACAAATCGT GCCGAATTTC CCTGAAGGTA TTCCTCAGGG AT -3' (SEQ ID NO.: 5)

Primer pfuf1 hybridisiert mit dem DNA-Bereich kodierend den Übergang aus
15 Signalsequenz und Lepirudin in dem Expressionvektor.

Der fettgedruckte Teil des Primers Hir_insev1 hybridisiert mit dem DNA-Bereich
kodierend den Übergang aus Prä- und Affenproinsulinsequenz in Plasmid pINT90d
und mit Sequenzen des 3'- Endes der Hirudinsequenz in Plasmid pK152. Primer

20 Hir_insev1 ist zu Primer Hir_insf1 100% komplementär.

Primer Insu11Hind3 markiert das 3'- Ende der in pINT90d klonierten DNA-Bereich
kodierend den Affenproinsulinsequenz und trägt zusätzlich die

Hexanukleotidsequenz für die Erkennung durch das Restriktionsenzym Hind3.

25 Zwei Standard Polymerasekettenreaktionen werden durchgeführt mit dem
Primerpaar Hir_insf1 / Insu11Hind3 auf dem Plasmid pINT90d als Matrize und mit
dem Primerpaar pfuf1/ Hir_insev auf dem Plasmid pBpfu_hir als Matrize . Die
Produkte beider Reaktionen werden vereint und ein Aliquot in einer dritten
Polymerasekettenreaktion mit den Primären pfuf1/Insu11Hind3 umgesetzt. Es
30 entsteht ein DNA-Produkt, das die Sequenz Signal (partiell)-Lepirudin-GNSAR-
Affenproinsulin beinhaltet. Das DNA-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen
BamH1 und Hind3 umgesetzt. BamH1 spaltet dabei in der Lepirudinsequenz und
Hind3 am 3'Ende der Proinsulin kodierenden Sequenz.

Parallel wird der Vektor pBpfu mit den beiden Enzymen umgesetzt und das große Vektorfragment isoliert. Die isolierten Produkte beider Reaktionen werden in einer T4-Ligasereaktion umgesetzt. Kompetente Zellen des Stammes E. coli K12 Mc1061 (Sambrook et al. „Molecular Cloning“ (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) werden mit dem Ligationsgemisch transformiert, auf NA-Platten, die 25µg/ml Ampicillin enthalten ausplattiert. Von Transformanten wird Plasmid-DNA zur Charakterisierung isoliert. Parallel wird von den über Plasmidanalyse charakterisierten Transformanten eine Erhaltungsplatte angelegt. Die DNA wird mittels Restriktions- und DNA-Sequenzanalyse charakterisiert. Ein als richtig erkanntes Plasmid erhielt die Bezeichnung pBpfuHir_Ins.

Beispiel 2: Konstruktion eines Ser-Hirudin-GNSAR-Affenproinsulin Fusionsproteins angeschlossen an die Signalsequenz des S. typhimurium Outer Membrane Protein (fimD)

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema.

Beispiel 10 der Patentanmeldung PCT/EP 00/08537 beschreibt die Konstruktion eines Vektor zur Ausschleusung von Lepirudin über die Signalsequenz des S. typhimurium Outer Membrane Proteins (Rioux, C.R., Friedrich, M.J. and Kadner, R.J.; J. Bacteriol. 172 (11), 6217-6222 (1990)). Das entstandene Plasmid erhält die Laborbezeichnung pBstyfim_hir. DNA der Plasmide pK152 und pINT90d dient jeweils als Matrize.

Zur Konstruktion werden 4 Primer benötigt.

Die Primer insu11Hind3, Hir_insf1 und Hir_insrev1 sind in Beispiel 1 beschrieben.

Neu synthetisiert wird der Primer styfimf1ser. Er hat folgende Sequenz:

5' CGGCGCTGAG TCTCGCCTTA TTTCTCACC TATCTTTTGC CTCTacgtat
actgactgcaCTG 3' (SEQ ID NO.: 6)

Das fett gedruckte DNA-Triplett markiert ein Codon für Serin. Damit entsteht ein Hirudin, das an Position 1 der Aminosäuresequenz anstelle von Leucin Serin trägt.

Entsprechend Beispiel 1 werden zwei Standard Polymerasekettenreaktionen durchgeführt mit dem Primerpaar Hir_insf1 / Insu11Hind3 auf pINT90d DNA als Matrize und mit dem Primerpaar styfimf1ser / Hir_insrev auf pK152 DNA als Matrize. Die Produkte beider Reaktionen werden vereint und ein Aliquot in einer dritten Polymerasekettenreaktion mit den Primern styfimf1ser / Insu11Hind3 umgesetzt. Es entsteht ein DNA-Produkt, das die Sequenz Signal (partial)- Ser Hirudin -GNSAR- Affenproinsulin beinhaltet. Das DNA-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Hind3 umgesetzt.

Parallel wird der Vektor pBstyfim_Hir mit den beiden Enzymen umgesetzt und das große Vektorfragment isoliert. Die isolierten Produkte beider Reaktionen werden in einer T4-Ligasereaktion umgesetzt. Kompetente Zellen des Stammes E. coli K12 Mc1061 werden mit dem Ligationsgemisch transformiert und von Transformanten Plasmid-DNA zur Charakterisierung isoliert. Parallel wird von den über Plasmidanalyse charakterisierten Transformanten eine Erhaltungsplatte angelegt. Die DNA wird mittels Restriktions- und DNA-Sequenzanalyse charakterisiert. Ein als richtig erkanntes Plasmid erhielt die Bezeichnung pBstyfim_SerHir_Ins.

Beispiel 3: Konstruktion eines Ala-Hirudin-R-Affenproinsulin Fusionsproteins angeschlossen an die Signalsequenz des alkalischen Phosphatase Vorläuferproteins aus E. coli

Der alkalische Phosphatase Vorläufer aus E. coli hat die Signalsequenz:

MKQSTIALAL LPLLFTPVTK A (SEQ ID NO.: 7)

(Shuttleworth H., Taylor J., Minton N.; Nucleic Acids Res. 14:8689, (1986)).

12

Die Peptidsequenz wird mit dem GCG-Programm (Wisconsin Package Version 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.) Backtranslate unter Gebrauch des "Coli High Codongebrauchs" in DNA übersetzt.

5 Diese hat die Sequenz:

5'ATGAAACAGTCGACCATCGCGCTGGCGCTGCTGCCGCTGCTGTTACACCCCG
GTTACCAAAGCG 3' (SEQ ID NO.: 8)

10 Zur Klonierung und den Anschluß an eine DNA-Sequenz, die für ein Hirudin
kodiert, das in Position 1 durch die Aminosäure Alanin charakterisiert ist (EP-A 0 448
093) wird diese Sequenz um die fett gedruckte Sequenz erweitert:

5'TTTTTTGAATTCATGAAACAGTCGACCATCGCGCTGGCGCTGCTGCCGCTGCTGTTG
15 ACCCCGGTTACCAAAG -CG GCTacgtat actgactgcaCTG (SEQ ID NO.: 9)

Daraus werden zwei Oligonukleotidsequenzen abgeleitet, die sich partiell überlappen.

Primer phoaf1 hat die Sequenz:

20 5'CTGCTGCCGCTGCTGTTACACCCGGTTACCAAAGCG GCTACG
TATACTGACTGCACTG -3' (SEQ ID NO.: 10)

Primer phoaf2 hat die Sequenz:

5'TTTTTTGAATTCATGAAACAGTCGACCATCGCGCTGGCGCTGCTGCCGCTGCTG -3'
25 (SEQ ID NO.: 11)

Zur Konstruktion des Expressionsvektors werden zudem die Primer insu11Hind3,
Hir_insf2 und Hir_insv2 und DNA der Plasmide pK152, pINT90d und pJF118
benötigt.

30

Primer Hir_insf2 hat die Sequenz:

5' - ATCCCTGAGGAATACCTTCAGcgaTTTGTGAACACGAC C -3' (SEQ ID NO.
12)

Primer Hir_insrev2 hat die Sequenz:

5' - GGTGCTGGTTCACAAAtcgCTGAAGGTA TTCTCAGGG AT-3' (SEQ ID NO.13)

- 5 Die Fettgedruckten Großbuchstaben markieren die mit dem Proinsulin hybridisierende Sequenz, während die Großbuchstaben in Standardausführung die Überlappung mit dem 3'- Ende der Hirudinsequenz beschreiben. Klein fett und unterstrichen dargestellt ist das Codon für das Brückenglied Arginin.
- 10 Entsprechend Beispiel 1 werden zwei Standard Polymerasekettenreaktionen durchgeführt mit dem Primerpaar Hir_insf1 / Insu11Hind3 auf pINT90d DNA als Matrize und mit dem Primerpaar phoa1 / Hir_insrev auf pK152 DNA als Matrize. Die Produkte beider Reaktionen werden vereint und ein Aliquot in einer dritten Polymerasekettenreaktion mit den Primern phoa / Insu11Hind3 umgesetzt. Es
- 15 entsteht ein DNA-Produkt, das die Sequenz Signal-ala-Hirudin-GNSAR-Affenproinsulin beinhaltet. Das DNA-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Hind3 umgesetzt. Parallel wird der Vektor pJF118 mit den beiden Enzymen umgesetzt und das große Vektorfragment isoliert. Die isolierten Produkte beider Reaktionen werden in einer T4-Ligasereaktion umgesetzt. Kompetente Zellen
- 20 des Stammes E. coli K12 Mc1061 werden mit dem Ligationsgemisch transformiert und von Transformanten Plasmid-DNA zur Charakterisierung isoliert. Parallel wird von den über Plasmidanalyse charakterisierten Transformanten eine Erhaltungsplatte angelegt. Die DNA wird mittels Restriktions- und DNA-Sequenzanalyse charakterisiert. Ein als richtig erkanntes Plasmid erhielt die
- 25 Bezeichnung pNS22.

Beispiel 4: Thrombinhemmtest

- 30 Die Bestimmung der Hirudinkonzentration wird entsprechend der Methode von Griebach et al. (Thrombosis Research 37, S. 347 -350 , 1985) durchgeführt. Dazu werden definierte Mengen eines Refludanstandards zur Erstellung einer Eichkurve in die Meßreihe mit einbezogen. Damit kann die Ausbeute direkt in mg /l angegeben werden. Die biologische Aktivität ist auch ein direktes Maß für die korrekte Faltung
- 35 des Proinsulinbestandteils des Fusionsproteins. Alternativ kann ein proteolytischer

S. aureus Verdau und die anschließende Analyse in einem RP-HPLC-System zur Bestimmung der korrekten S-S-Brückenbildung eingesetzt werden.

5 Beispiel 5: Expression des Fusionsproteins

Rekombinante Zellen werden über Nacht in 2YT-Medium (pro Liter: 16g Tryptone, 10g Yeast extract, 5g NaCl), das 100µg/ml Ampicillin enthält, angezogen. Von der Übernachtskultur wird eine 1:50 Verdünnung in frischem Medium angelegt und die
10 Zellen bis zu einer Dichte von ungefähr 0,8 O. D. ₆₀₀ Einheiten angezogen.

Dann wird IPTG zur Induktion der Expression so zugesetzt, daß sich eine Konzentration von 0,05–2mM einstellt. Die so induzierten Zellen werden über 3–26 h weiter inkubiert.

15

Nach drei Stunden wird im Überstand eine deutlich meßbare antithrombotische Hirudinwirkung festgestellt, die auf die Sekretion des gewünschten Fusionsproteins zurückgeführt werden kann, da in der SDS-PAGE Analyse nach Coomassie Blue Färbung nur bei induzierten Zellen eine neue Bande entdeckt wird, die in der
20 Western Blot Analyse mit polyklonalen gegen Insulin gerichteten Antikörpern reagiert. Bei Fermentationsexperimenten wird die Induktion erst nach Anzucht auf wesentlich höhere optische Dichten eingeleitet. Bevorzugt sind hier synthetische Medien auf Basis von Minimalmedium.

Die Produktivität der Zellen läßt sich dadurch erhöhen, daß man das Prinzip des
25 'Bacterial milkings' anwendet, d.h. daß man die Zellen nach optimaler Induktionszeit schonend von dem Überstandsmedium abtrennt und in frischem Medium, dem man wieder Induktor zusetzen kann, weiter inkubiert. Aus dem geernteten Überstand wird dann parallel Insulin hergestellt.

30

Beispiel 6: Reinigung des Fusionsproteins

Am Ende der Induktion wird in dem Zellüberstand ein pH von 2,5 – 3 eingestellt und Zellen und Übersandskomponenten durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt.

Der Fällungsüberstand wird auf eine Kationentauschersäule (Hyper DF) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 150 bis 450mM NaCl bei pH 3,5 in Gegenwart von 30% 2-Propanol aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen werden mittels RP-HPLC analysiert. Das Proinsulin-Hirudin-Fusionsprotein eluiert bei einer NaCl-Konzentration von etwa 300mM. Fraktionen mit hinreichender Reinheit werden
5 vereinigt, mit 0,1% TFA verdünnt und auf eine RP-Säule gepumpt (PLRP -S 7,5 x 50mm). Die Elution erfolgt mit einem Gradienten von 25-50% Acetonitril. Zwei Fraktionsgruppen werden gepoolt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Material gefriergetrocknet. Die Reinheit des Materials wird mittels SDS-
10 Polyacrylamidelektrophorese überprüft. Das gereinigte Fusionsprotein wird Massenspektrometrisch (ESI) analysiert. Das experimentell ermittelte Molekulargewicht entspricht dem theoretisch nach Abspaltung des Signalpeptides zu erwartenden Molekulargewichts des Fusionsproteins.

15 Beispiel 7: Ermittlung der Disulfidbrückenknüpfung

Das Fusionsprotein wird mit Trypsin verdaut und die entstehenden Bruchstücke mittels RP-HPLC und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert. Es gelingt die Identifizierung eines Fragmentes, das aufgrund der Masse von 5706 dt
20 als Des (B30)-Insulin erkannt wird. Dieses Produkt wird einem Verdau mit S. aureus V8-Protease unterworfen. Es entsteht das erwartete Peptidmuster in der RP-HPLC-Analyse.

Die Trypsinspaltung wird wie folgt durchgeführt :

25

Das gefriergetrocknete Fusionsprotein wird in 50mMTris/ HCL pH 8 gelöst (1mg/ml) und mit Trypsin (1µg/mg Fusionsprotein) versetzt. Trypsin wird am Ende der Reaktion bei pH 3 inaktiviert.

30 Der S. aureus Verdau wird wie folgt durchgeführt:

Das isoliert Des (B30)-Insulin wird in Wasser bei (pH 8) gelöst und mit S. aureus Protease (1/50 der Insulinmenge) versetzt, 5 Stunden bei 37°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Beispiel 8: Reinigung von Insulin

5 Das Fusionsprotein wird überraschend bei einem pH von 2,5–3 im Gegensatz zu den meisten übrigen Polypeptiden, die sich im Überstand sei es durch spontane Lyse von Wirtszellen oder Sekretion finden, nicht ausgefällt. Das Kulturmedium wird daher entsprechend angesäuert und anschließend nach Abschluß der Fällung wird der Niederschlag und die Zellen abzentrifugiert bzw. durch eine Mikrofiltration
10 abgetrennt und konzentriert.

Anschließend wird das Medium auf pH 6,8 eingestellt. Parallel wird über analytische HPLC-Messung der Gehalt an Fusionsprotein bestimmt. Nach der Bestimmung wird dem Überstand Trypsin zugesetzt, so daß pro 1–1,5 mg Fusionsprotein ca. 1 µg
15 Trypsin eingestellt sind. Nach einer Inkubation von ca. 4 Stunden bei Raumtemperatur erfolgt eine Reinigung über Kationentauscherchromatographie bei einem pH von 3,5 und in Gegenwart von 2-Propanol. Die Elution erfolgt in dem Puffer unter Anlegen eines Gradienten von 0,15 molar bis 0,45 molar.

20 Di-Arg Insulin eluiert bei ca. 0,3 molar. Nach 1:1 Verdünnung wird aus den Insulin-haltigen Fraktionen bei pH 6,8 unter Zusatz einer 10% -igen $ZnCl_2$ -Lösung Di-Arg Insulin ausgefällt. Das Insulin wird abfiltriert und anschließend in 0,05 M Tris-HCL (pH 8,5) aufgelöst, so daß eine Lösung von 2mg/ml entsteht.

Dann wird ungefähr die Menge von einer 1 Einheit Carboxypeptidase B pro 100ml
25 Lösung zugesetzt und unter schwachem Röhren die Reaktion durchgeführt. Anschließend wird ein pH von 5,5 mit Zitronensäure eingestellt und Insulin in Anwesenheit von $ZnCl_2$ auskristallisiert. Die Kristalle werden abgetrennt aufgelöst und nach einem Reinigungsschritt über RP-HPLC wird Insulin erneut durch
... Kristallisation gereinigt.

Beispiel 9: Prozessierung des Fusionsproteins direkt im Kulturmedium

Am Ende des Expressionsabschnittes wird das Kulturmedium auf pH 6,8 eingestellt und anschließend Trypsin eingerührt, so daß eine Endkonzentration von 4–8 mg pro
5 Liter eingestellt wird. Nach Inkubation über ca. 4 Stunden wird die so behandelte Fermentationsbrühe auf pH 2,5–3 eingestellt. Nach 1–6 Stunden der Fällung wird der pH auf 3,5 angehoben und in Gegenwart von 30% 2-Propanol das entstandene Di-Arg-Insulin über Kationentauscherchromatographie gereinigt. Die Elution erfolgt
10 mittels eines NaCl-Gradienten, von 0,05–0,5 M Salz. Die produkthaltigen Fraktionen werden 1:1 mit H₂O und anschließend mit ZnCl₂ versetzt, so daß eine 0,1%-ige ZnCl₂ Lösung entsteht. Bei pH 6,8 fällt Di-Arg-Insulin aus. Dies wird beispielhaft entsprechend Beispiel 8 in Insulin umgewandelt.

Patentanspruch:

1. DNA kodierend für ein Fusionsprotein der Form

5 -F-As_m-R_n-Y-

wobei

F eine DNA - Sequenz kodierend für eine Aminosäurefolge, die die
Sekretion eines Proteins Y in ein Fermentationsmedium erlaubt,

As einer chemischen Bindung oder einer DNA - Sequenz kodierend für
10 eine gentechnisch kodierbare Aminosäure,

m eine ganze Zahl von 0 - 10,

R einer chemischen Bindung oder einem Codon für Arginin,

n 0 oder 1,

Y eine DNA - Sequenz kodierend für ein Protein von Interesse, das
15 korrekt gefaltet als Bestandteil des Fusionsproteins im
Fermentationsmedium vorliegt,

entspricht.

Aventis Pharma Deutschland GmbH

AVE D-2001/A009

Dr. OL

Zusammenfassung

5 Fusionsprotein zur Sekretion von Wertprotein in bakterielle Überstände

Die Erfindung bezieht sich auf Fusionsproteine bestehend aus einem Fusionsteil und einem Wertprotein wobei die Kombination aus beiden Proteinen dazu führt, daß das Fusionsprotein in den Überstand eines bakteriellen Wirtes sezerniert wird und das

10 Wertprotein in seiner korrekten räumlichen Struktur vorliegt.